

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-31482

(43) 公開日 平成7年(1995)2月3日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09	Z N A			
C 0 7 K 14/53		8318-4H		
C 1 2 P 21/02		H 9282-4B		
// (C 1 2 P 21/02				
		9050-4B	C 1 2 N 15/ 00	Z N A A
		審査請求	未請求	請求項の数5 F D (全 12 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平5-200129

(22) 出願日 平成5年(1993)7月21日

(71) 出願人 000173533

財団法人ライフテクノロジー研究所
東京都中央区日本橋本町3丁目4番5号

(72) 発明者 岡部 哲郎

東京都文京区小石川5-11-15-306

(72) 発明者 桔梗 伸明

東京都文京区本郷3-17-12-303

(72) 発明者 下西 学

京都府宇治市宇治野神60-30

(74) 代理人 弁理士 山田 文雄 (外1名)

(54) 【発明の名称】 組換えヒト単球成長因子、及びこれをコードするDNA配列

(57) 【要約】

【構成】 ヒト単球末梢血単球の分化・増殖を誘導する組換えヒト単球成長因子、その部分的アミノ酸配列、及びこれをコードするDNA配列。ヒト肺ガン細胞株T3M-30Luから得られたcDNAよりヒト単球成長因子の全DNA配列及びアミノ酸配列が決定されたものであり、ヒトフェリチンH鎖と同じDNA配列及びアミノ酸配列を有する。また組換えヒト単球成長因子の製造方法を併せて提供する。

【効果】 単球の関与する生体防御反応を促進する薬剤としての用途が期待できる。

Met Thr Thr Ala Ser Thr Ser Gln Val Arg Gln Asn Tyr His Gln 15
Asp Ser Glu Ala Ala Ile Asn Arg Gln Ile Asn Leu Glu Leu Tyr 30
Ala Ser Tyr Val Tyr Leu Ser Met Ser Tyr Tyr Phe Asp Arg Asp 45
Asp Val Ala Leu Lys Asn Phe Ala Lys Tyr Phe Leu His Gln Ser 60
His Glu Glu Arg Glu His Ala Glu Lys Leu Met Lys Leu Gln Asn 75
Gln Arg Gly Gly Arg Ile Phe Leu Gln Asp Ile Lys Lys Pro Asp 90
Cys Asp Asp Trp Glu Ser Gly Leu Asn Ala Met Glu Cys Ala Leu 105
His Leu Glu Lys Asn Val Asn Gln Ser Leu Leu Glu Leu His Lys 120
Leu Ala Thr Asp Lys Asn Asp Pro His Leu Cys Asp Phe Ile Glu 135
Thr His Tyr Leu Asn Glu Gln Val Lys Ala Ile Lys Glu Leu Gly 150
Asp His Val Thr Asn Leu Arg Lys Met Gly Ala Pro Glu Ser Gly 165
Leu Ala Glu Tyr Leu Phe Asp Lys His Thr Leu Gly Asp Ser Asp 180
Asn Glu Ser

【特許請求の範囲】

単球の分化・増殖を誘導する組換ヒト単球成長因子：

【請求項1】 下記の部分的アミノ酸配列を有し、ヒト

Met Thr Thr Ala Ser Thr Ser Gln Val Arg Gln Asn Tyr His Gln Asp Ser Glu
Ala Ala Ile Asn Arg Gln Ile Asn Leu Glu Leu Tyr Ala Ser Tyr Val Tyr Leu
Ser Met Ser Tyr Tyr Phe Asp Arg Asp Asp Val Ala Leu Lys Asn Phe Ala Lys
Tyr Phe Leu His Gln Ser His Glu Glu Arg Glu His Ala Glu Lys Leu Met Lys
Leu Gln Asn Gln Arg Gly Gly Arg Ile Phe Leu Gln Asp Ile Lys Lys Pro Asp
Cys Asp Asp Trp Glu Ser Gly Leu Asn Ala Met Glu Cys Ala Leu His Leu Glu
Lys Asn Val Asn Gln Ser Leu Leu Glu Leu His Lys Leu Ala Thr Asp Lys Asn
Asp Pro His Leu Cys Asp Phe Ile Glu Thr His Tyr Leu Asn Glu Gln Val Lys
Ala Ile Lys Glu Leu Gly Asp His Val Thr Asn Leu Arg Lys Met Gly Ala Pro
Glu Ser Gly Leu Ala Glu Tyr Leu Phe Asp Lys His Thr Leu Gly Asp Ser Asp
Asn Glu Ser

【請求項2】 ヒト単球の分化・増殖を誘導する組換ヒト単球成長因子をコードする核酸配列を有するDNA配列。

【請求項3】 ヒト単球の分化・増殖を誘導する組換ヒト単球成長因子をコードする核酸配列が以下の核酸配列である請求項2記載のDNA配列：

ATG ACGACCGCGT CCACCTCGCA GGTGCGCCAG AACTACCACC
AGGACTCAGA GGCCGCCATC AACCGCCAGA TCAACCTGGA GCTCTACGCC TCCTACGTTT
ACCTGTCCAT GTCTTACTAC TTTGACCGCG ATGATGTGGC TTTGAAGAAC TTTGCCAAAT
ACTTCTTCA CCAATCTCAT GAGGAGAGGG AACATGCTGA GAACTGATG AAGCTGCAGA
ACCAACGAGG TGGCCGAATC TTCCTTCAGG ATATCAAGAA ACCAGACTGT GATGACTGGG
AGAGCGGGCT GAATGCAATG GAGTGTGCAT TACATTGGA AAAAAATGTG AATCAGTCAC
TACTGGAAT GCACAACTG GCCACTGACA AAAATGACCC CCATTGTGT GACTTCATTG
AGACACATTA CCTGAATGAG CAGGTGAAAG CCATCAAAGA ATTGGGTGAC CACGTGACCA
ACTTGCGCAA GATGGGAGCG CCGAATCTG GCTTGGCGGA ATATCTCTTT GACAAGCACA
CCCTGGGAGA CAGTGATAAT GAAAGC

【請求項4】 請求項1記載の部分的アミノ酸配列をコードする核酸配列を有するDNA配列。

【請求項5】 ヒト単球の分化・増殖を誘導するヒト単球成長因子をコードするDNAで形質転換された宿主細胞を、発現可能な条件下で培養して請求項1記載の組換ヒト単球成長因子を産生させ、これを採取することを特徴とする組換ヒト単球成長因子の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明はヒト末梢血単球の分化・増殖を誘導する組換ヒト単球成長因子、その部分的アミノ酸配列、及びこれをコードするDNA配列に関するものである。また本発明は組換ヒト単球成長因子の製造方法に関する。

【0002】

【発明の背景】 血液幹細胞は分化して、いろいろな機能を持った細胞になる。このような細胞は多能性幹細胞とよばれ、その増殖や分化には特定の増殖因子や分化因子を必要とする。血液幹細胞から顆粒球やマクロファージへの分化には以下の4つのCSF (colony stimulating factor:コロニー刺激因子)が必要であることが知られている。1つ目は、インターロイキン3 (interleukin 3: IL3) として知られる多能性 (multi)-CSFであり、顆粒球、マクロファージ及びそれらの前駆細胞を分

化・増殖させる。2つ目は、顆粒球を分化・増殖させる顆粒球CSF (G-CSF)、3つ目は、マクロファージを分化・増殖させるマクロファージCSF (M-CSF)、4つ目は、顆粒球とマクロファージの両方の細胞系列の増殖を促進する顆粒球・マクロファージCSF (GM-CSF)である。

【0002】 これら4つのCSFは、マウスのものについてはその構造も、DNA配列も明らかになっている (Metcalf, D., Science, 229, 16, (1985); 岡部哲郎ほか: 医学の歩み, 135, 1037, (1985))。ヒト由来のCSFもその殆んどは、マウスのCSFと同様の機能、構造を有する。しかし、ヒトマクロファージを刺激するようなヒト由来のM-CSFは見い出されていない。例えば、ヒト由来のM-CSFはマウスM-CSFと相同で免疫的にも交叉反応を示し、マウスの骨髓細胞に対しCSF活性を有する。しかしヒトの骨髓細胞にはCSF活性を示さない (臨床科学, 22, 255, (1986), Dao, S. K. et al., Blood, 58, 630, (1981))。

【0003】 一方、ヒト末梢血液の単球は分裂・増殖しない細胞と一般に考えられていたものであるが、発明者らはレクチンで刺激したリンパ球細胞の培養液中にヒト単球を増殖・分化させる液性因子を見出し、末梢血液の単球も分裂・増殖することを明らかにしている (Biochem. Biophys. Res. Commun., 125, 705-711, (1985))。この液

性因子はリンパ球細胞培養液中の分子量25,000と60,000の2つの分画に存在し、また抗M-CSF抗体や抗GM-CSF抗体でその活性が部分的に吸収される。従ってこの液性因子はM-CSFやGM-CSFなどの種々の液性因子の混合物であって、その機構は不明であるが、これらの共働作用によってヒト単球の増殖・分化を刺激するものと考えられる。

【0004】このような状況下において、発明者の一人は、ヒト末梢血液の単球の増殖・分化を起す蛋白性因子をヒト肺ガン細胞株の培養液中に見出し、これを単独物質として純化し、その生理活性を調べたところ、既知のCSFやγ-インターフェロンとも異なる新規生理活性物質であることを確認した(特開平3-145499、Okabe et al., Cancer Research, 5, pp3863-3865, (1990))。

【0005】この新規生理活性物質すなわちヒト単球成長因子(MoGF)は、ヒト肺ガン細胞株T3M-30Luからその培養液中に産生されるの蛋白性因子であり、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動により単一バンドを示す単独物質であった。その分子量は電気泳動上、12.5%アクリルアミドゲル濃度で約21,000ダルトン、20%アクリルアミドゲル濃度で約24,000ダルトンであった。このヒト単球成長因子は単球の関与する生体防御反応を促進する薬剤としての用途が期待でき、種々の感染防御、免疫機能亢進、マクロファージの関与するガン免疫の亢進などの作用を有する薬剤としての用途を提供するものである。

【0006】発明者らはさらに、cDNAクローニングを試みた。すなわち、このヒト単球成長因子の部分的アミノ酸配列の解析から、ヒト単球成長因子とヒトフェリチンH鎖との相同性を見だし、ヒトフェリチンH鎖のDNA配列からプライマー配列を選択してcDNAクローニングを行った。その結果、ヒト単球成長因子の全アミノ酸配列と、これをコードする核酸配列を明らかにすることに成功した。

【0007】

【発明の目的】従って本発明の目的は、ヒト末梢血単球の分化・増殖を誘導する組換えヒト単球成長因子、その部分的アミノ酸配列、及びこれをコードするDNA配列を提供することにある。また本発明の目的は組換えヒト単球成長因子の製造方法を提供することにある。

【0008】

【発明の構成】本発明の組換えヒト単球成長因子は図1に示される183個のアミノ酸からなる部分的アミノ酸配列を有する。

【0009】また本発明の組換えヒト単球成長因子をコードするDNA配列は図2に示される549塩基である。ただし本発明のDNA配列では図2のDNA配列に限られず、図1に示した部分的アミノ酸配列をコードし得るDNA配列をすべて含むものである。図2に示したDNA配列は、後述するように、ヒト単球成長因子(MoGF)

F)を産生するヒト肺ガン細胞株T3M-30LuのmRNAより得たcDNA配列である。

【0010】さらに、ヒト単球成長因子をコードするDNAで形質転換された宿主細胞を、発現可能な条件下で培養し、産生されたヒト単球成長因子を採取することにより、組換えヒト単球成長因子の製造することができる。ヒト単球成長因子をコードするDNAは適当なプロモータ、ターミネータ、シグナル配列など、さらに必要に応じて適当なマーカー遺伝子をつけてベクターに組み込むことができる。ベクターは宿主培養細胞で機能するものであればどのような種類のものでもよい。これらの発現ベクターの構築、細胞内発現などは全て慣用技術で行うことができる(参考、Maniatis et al, "Molecular Cloning: A laboratory manual" Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1982))。

【0011】

【実施例1】

ヒト単球成長因子の精製

特開平3-145499記載の方法に従って、ヒト肺ガン細胞株T3M-30Luの培養濾液(conditioned medium)を集めて本因子を精製した。ヒト肺ガン細胞株T3M-30Luは、発明者らにより肺の大細胞ガン(large cell carcinoma)から樹立された細胞株であり、発明者の研究室において継代培養させたものであり、この細胞株が本発明のヒト単球成長促進因子を産生する。この細胞株は工業技術院微生物工業技術研究所に寄託されている(受託番号:微工研条寄第3120号(FERM BP-3120))。

【0012】T3M-30Lu細胞を10%FBS(胎児牛血清)添加F-10培地でコンフルエント(confluent)に成長させた後、培地を無血清培地(Dulbecco変法Eagle培地(DMEM):F-10培地=3:1)に交換した。1週間ごとに新鮮無血清培地と交換し、その培養濾液(conditioned medium)1220Lを集めた。以下120Lずつ以下の処理を行った。

【0013】この培養濾液を、まずホローファイバースeparator-SEP-1013(旭化成社製;分子量3000)で低分子成分を除去し、50倍に濃縮した。この濃縮培養液をpH7.5で硫酸分画した。30~60%の飽和硫酸による沈澱を遠心(35,000g,30分間)により集めた。この沈澱を50mM Tris-HCl(pH7.5)に溶解後、遠心して不溶成分を除去し、遠心上清をホローファイバースeparator-SEP-1013(旭化成社製、分画分子量6,000)で限外濾過し、10倍に濃縮した。

【0014】この濃縮液200μlをスーパーコース12カラム(HR10/30, Pharmacia LKB Biotechnology社製)にてゲル濾過した。このカラムをFPLC(fast performance liquid chromatography; Pharmacia LKB Biotechnology社製)に装着し、50mM Tris-HCl(pH7.5)を流速1ml/分で流し、MoGF活性を有する分画を集めた。集めた分画は、ホローファイバースeparator-SEP-1013

(旭化成社製、分画分子量 3,000) にて 10 倍に濃縮し、遠心 (30,000g, 30 分, 4 °C) で不溶成分を除去した後、モノーQカラム (HR 5/5, Pharmacia LKB Biotechnology 社製) に直接アプライしてイオン交換クロマトグラフィーを行なった。カラムは 50mM Tris-HCl (pH7.5) で、溶出開始後 15 分までは 0-200mM の NaCl の直線濃度勾配をつけ、15 分から 30 分までは 200 mM NaCl, 30 分から 45 分までは 200-400mM NaCl の濃度勾配をつけて流速 1ml/分 で溶出した。MoGF 活性が認められる分画 (約 280mM NaCl により溶出される分画) を集めた。

【0015】次に、この活性画分を逆相 HPLC でさらに精製した。東洋曹達社製 HLC-803D HPLC システムに装着した Vydac C₄ カラム (4.6 × 250mm ; The Separations Group 社製) にモノーQカラムの活性画分を直接アプライした。0.1% トリフルオロ酢酸 (TFA) を 10 分間流してカラムを洗浄した後、0.1% TFA に対して 30 分間で 0-90% アセトニトリルで直線濃度勾配により流速 0.5ml/分 で溶出し、0.5 mL づつ分画した。MoGF 活性を有する分画 (65% アセトニトリルで溶出された分画) を集め、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (アクリルアミド濃度 20%) で分析したところ、単一バンドを示し、その分子量は約 24,000 であった。

【0016】

【実施例 2】

ヒト単球成長因子の部分的アミノ酸配列の解析

実施例 1 で得られたヒト単球成長因子 (MoGF) 精製品 (逆相 HPLC の活性分画) を、Cleveland et al (J. Biol. Chem., 252, pp1102-1106 (1977)) の方法に従い、電気泳動ゲル内で限定分解し、得られた分解物のアミノ酸配列を解析した。

【0017】すなわち、まず逆相 HPLC の活性分画を凍結乾燥し、ゲル濃度 20% で SDS-ポリアクリルアミド電気泳動を行った。このゲル濃度ではヒト単球成長因子 (MoGF) は約 24 KD の位置に泳動される。この 24 KD のバンド (約 15 μg の蛋白を含有) を切出し、SDS-PAGE の緩衝液で 1 時間平衡化した。平衡化したゲルは、第 2 の SDS 電気泳動ゲルのレーンに載せ、さらにそのレーンに V8 プロテアーゼを 30 μg 加えた。電気泳動を開始して、色素の先端がスタッキング・ゲルの 1/2 の位置まで泳動された時点で、通電を止め、そのまま 37 °C 1 時間インキュベートした。これによりスタッキング・ゲル内で、蛋白限定分解が行われる。その後再び通電して電気泳動を行い、分解産物を分離した。

【0018】第 2 の SDS 電気泳動ゲル上の分解産物は、Towbin et al の方法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, pp4350-4354, (1979)) に従ってエレクトロ・プロットにより、polyvinylidene difluoride 膜へ転写した。分解産物は分子量 2.5 KD ~ 12 KD にわたって 14 本のバンドに別れていた。この 14 本のバンドをそれぞれ切出し、各バンド中の分解産物のアミノ酸配列を、アミノ酸自動分析装置 (ABI477A Protein Sequencer, 120 A Analyzer; Applied Biosystems 社製) を用いて、それぞれ N 末端より順次解析した。解析結果を表 1、2 に示す。表中「xxx」は不明のアミノ酸残基である。該当箇所に複数のアミノ酸残基の可能性のあるものについてはその全てを各該当箇所の下に列記した。

【0019】

【表 1】

N 末端よりのアミノ酸配列

No. 1	Val Ile Leu Pro Asn Asn Asp Arg His Gln Ile . . .
	Pro Asn
No. 2	Val Ile Leu Pro Asn Asn Asp Arg . . .
	Pro
No. 3	Ala Ala Ile Asn Arg Gln Ile Asn Leu xxx xxx Tyr Ala
	Asp Asp Asp
	Glu
No. 4	xxx Ala Leu xxx Leu Glu Lys
	Ile Ile Glu
	His
	Ile
No. 5	Leu His Lys Leu Ala Thr Asp Lys Asn Asp Pro His Leu . .
No. 6	Leu His Lys Leu Ala Thr Asp Lys . .
No. 7	xxx Ala Leu His Ala Glu Lys Asn Val Asn Gln xxx Leu
	Pro Leu
	Val
	Lys

N末端よりのアミノ酸配列

No. 8	xxx Ile Pro His Glu Glu Lys Asn
	Leu Leu Phe
	Lys Leu
No. 9	Leu His Lys Leu Ala Thr Asp Lys Asn . .
	Pro Glu Asn
	Tyr Pro
No. 10	Leu His Lys Leu Ala Thr Asp Lys Asn Asp Pro His Leu xxx Asp -
	Ile Asp Asn - Phe Ile Glu . . .
	Tyr Pro
	Pro
	Val
	Glu
No. 11	Val Ile Leu Pro . . .
No. 12	Val Ile Leu Pro . . .
No. 13	Val Ile Leu Pro . . .
No. 14	Val Ile Leu Pro . . .

【0021】得られた各バンドのアミノ酸配列を、データベースを使用して、既知たんぱく質のアミノ酸配列と比較した。バンドNo. 1, 2, 11~14は蛋白限定分解に使用したV8プロテアーゼのN末端部に対応するものであり、V8プロテアーゼ由来の断片と考えられた。一方、バンドNo. 3~10の8つの分画断片はいずれも、図3に示すヒトフェリチンH鎖 (Ferritin Heavy Chain) のアミノ酸配列 (Boyd et al., J. Biol. Chem. 260, pp 11755-11761, (1985)) と極めてよい一致を見た。

【0021】すなわち、バンドNo. 3の分解産物は図3に示すヒトフェリチンH鎖の19位のアラニン以降のアミノ酸配列と一致していた。またバンドNo. 4とバンドNo. 7の分解産物はフェリチンH鎖の103位のシステイン以降のアミノ酸配列とよく一致していた。バンドNo. 5, 6, 9, 10の分解産物はフェリチンH鎖の118位のロイシン以降のアミノ酸配列とよく一致していた。バンドNo. 8の分解産物はフェリチンH鎖の103位のシステイン以降のアミノ酸配列と相同性が見られた。

【0022】以上の結果からヒト単球成長因子 (MoGF) はヒトフェリチンH鎖と同一のものであることが強く示唆された。そこで、MoGF産生細胞であるヒト肺ガン細胞株T3M-30LuからヒトフェリチンH鎖のcDNAクローニングを行い、得られるヒトフェリチンH鎖にMoGF活性があるかどうかを以下検証した。

【0023】

【実施例3】

ヒトフェリチンH鎖のcDNAクローニング: T3M-30Lu細胞の全mRNAを鋳型にして、以下のように、ヒトフェリチンH鎖のcDNAを得て、これをPCR (Polymerase Chain Reaction) により増幅した。

【0024】Hentze et al (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, pp7226-7230 (1986)) により明らかにされているヒトフェリチンH鎖遺伝子のDNA配列 (図4参照) から、5'末端側の20塩基をプライマー1に、その相補鎖の5'末端20塩基をプライマー2に採用し、PCRに使用する各20merのプライマーを合成した。

【0025】

【表3】

プライマー1	5' TCTCCTTAGTCGCGCCATG 3'
プライマー2	3' GTTCCGTCACGTACGTACAA 5'

【0026】T3M-30Lu細胞の培養物から、常法 (Analytical Biochemistry, 162, pp156-159 (1987)) に従って、全mRNA (11.3 µg) を調製した。これを鋳型にして、Amersham社製cDNA合成システム「ブラ

スファーストストランドcDNA合成」表3のプライマー2をDNAプローブとして使用し逆転写酵素によりcDNAの第1鎖を合成した。反応系はAmersham社製cDNA合成システム「プラスファーストストランドcDN

A合成」の1 μ g mRNAの系を使用した。

【0027】得られたcDNAを鋳型としてプライマー1、2を用いて、tTHポリメラーゼを使用してPCR反応を行い、両プライマー間の塩基配列を有するcDNAを増幅した。すなわち、先のcDNA合成反応の反応液20 μ Lのうち5 μ Lを取り、これに、10 \times PCRバッファーを10 μ L、5mM dNTPsを4 μ L、各プライマーは20 OD/mLの濃度で1 μ Lずつ、tTHポリメラーゼ (TOYOBO社製) を1 μ L、Perfect matchch (TOYOBO社製) を1 μ L、蒸留水を77 μ L加えて反応させた。反応は95 $^{\circ}$ Cで5分間行った後、95 $^{\circ}$ Cで1分間、55 $^{\circ}$ Cで5分間、75 $^{\circ}$ Cで3分間のサイクルで40サイクル行った。PCR反応終了後、反応液をアガロースゲル電気泳動にかけ、ヒトフェリチンH鎖遺伝子の塩基数に相当する泳動位置のバンドを切出し、ヒトフェリチンH鎖遺伝子をアガロースゲルから抽出した。

【0028】得られたヒトフェリチンH鎖cDNAを、クローニングベクターであるBlue Script SK+ (Stratagen: TOYOBO社製) のマルチクローニングサイト (MCS) にあるEcoRV部位 (平滑末端である) に挿入し、サブクローニングを行った (図5参照)。得られた23クローン中、6クロンのcDNAインサートについてDNA配列を確認したところ、2クローンがヒトフェリチンH鎖cDNAを有していた。そのうちのひとつのクローンpBS (Ferritin H) 36を、以下の発現ベクターの構築に使用した。

【0029】

【実施例4】

発現ベクターの構築：大腸菌用発現ベクターとして、ヒトフェリチンH鎖と菌体タンパクとの分離を容易にするため、アフィニティ精製が可能なヒュージョン蛋白を発現するpGEX-2T (Pharmacia社製; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 8703, (1986) 及びNature, 338, 585, (1989) を参照) を使用した。このpGEX-2TはグルタチオンSトランスフェラーゼ (以下GSTという) との融合蛋白質を発現するベクターである。ベクターpGEX-2TをSmaI、EcoRIで処理して、マルチクローニングサイト (MCS) にあるSmaI-EcoRI領域を取り除いて、ベクターを開いた。一方、先に得られたcDNAクローンpBS (Ferritin H) 36をHagIで処理後、Klenow断片で平滑末端とし、その後EcoRIで消化した。得られた断片をベクターpGEX-2TのSmaI-EcoRI領域に挿入した (図6参照)。得られた発現ベクターpGEX (Ferritin H) 3のDNA挿入部位のフレームはDNA配列解析により確認したところ、図7に示すものであった。

【0030】

【実施例4】

ヒトフェリチンH鎖の発現：大腸菌JM109を発現ベクターpGEX (Ferritin H) 3でトランスフォーメーション

して発現用菌株を得た。この菌株をLB培地で一晚増殖させた後、100倍量のLB培地に加え、さらに37 $^{\circ}$ Cで振盪培養した。培養液の吸光度 (A_{600}) が0.5となった時点で、IPTG (Isopropyl- β -D(-)-thiogalactopyranoside) を終濃度1mMとなるように加え、その後さらに4時間培養を続けた。なおIPTGはGST融合蛋白質を発現させるために加えるものである。

【0031】ヒトフェリチンH鎖の精製：7Lの培養液を遠心 (8000 rpm, 10分, 4 $^{\circ}$ C) して、菌体を集めた。得られた菌体は、700 mLの20mM磷酸緩衝液 (pH7.2)、150 mM NaCl、1% Triton X-100に懸濁した後、ソニケーションにより菌体を破碎し、発現物を可溶化させた。1000 rpm, 10分, 4 $^{\circ}$ Cの条件で遠心して固型夾雑物を取り除いた後、得られた上清に20mLのグルタチオン・セファロース4Bビーズ (Glutathion Sepharose 4B beads: Pharmacia社製) を懸濁させ、4 $^{\circ}$ Cで1時間静かに攪拌した。これによりグルタチオン・セファロース4Bビーズに融合蛋白質を吸着させた。軽く遠心して回収したゲル・ビーズを100mLのPBSで3回洗浄した。その後10mLの50mM Tris-HCl (pH8.0)、15mM グルタチオン溶液で数回溶出し、GSTと融合している融合蛋白質を得た。

【0032】得られた溶出液に、CaCl₂ を終濃度2.5mMとなるように加えた後、溶出液中の蛋白質の1/30量のトロンピンを加え、25 $^{\circ}$ Cで1時間半処理した。これにより、融合蛋白質をGST部分とクローン蛋白 (すなわちヒトフェリチンH鎖) 部分とに切断した。EDTA (エチレンジアミン四酢酸) を終濃度10mM加えてトロンピン消化を停止した後、4 $^{\circ}$ C下でPBSで透析した。透析後の溶液は約75mLであり、その蛋白濃度は約100 μ g/mLであった。これをSDS-PAGEにかけたところ、ヒトフェリチンH鎖相当蛋白質の純度は約20%であった。

【0033】ヒトフェリチンH鎖以外の夾雑蛋白を除去するため、透析後の溶液を75 $^{\circ}$ Cで5分間熱処理し、夾雑蛋白を熱変性・沈澱させた。遠心 (10000 g, 5分) により沈澱した蛋白を除去してサンプルAを得た。SDS-PAGEで確認したところ、主バンド (ヒトフェリチンH鎖に相当する蛋白質) は95%以上となった。この主バンドを切出し、その蛋白のN末端領域についてアミノ酸配列解析を前記方法と同じようにして行ったところ、その配列は既報のヒトフェリチンH鎖アミノ酸配列 (図3) と一致していた。従って、サンプルAは純度95%以上のヒトフェリチンH鎖を含有することが確認できた。続いてサンプルAを用いてMoGF活性のアッセイを行い、ヒトフェリチンH鎖にMoGF活性があるかどうかを調べた。

【0034】なお比較例として、ヒトフェリチンH鎖遺伝子を挿入していないベクターpGEX-2Tを用いて、大腸菌JM109を形質転換し、以下その発現、その後の精製 (すなわちグルタチオン・セファロース4Bビー

ズによる融合蛋白質の吸着及び溶出、トロンビン処理、熱処理など)を、上記pGEX (Ferritin H)の場合と全く同様に操作してサンプルBを得た。このサンプルBにはSDS-PAGE上ほとんど蛋白は存在しなかったが、比較のためのこのサンプルBについてもMoGF活性のアッセイを行った。

【0035】

【実施例5】

MoGF活性のアッセイ(1)：単球成長因子(MoGF)活性は、培養プレート(Falcon 3047)に播種12日後の単球の生存率を計数することにより測定した。

【0036】ヒト末梢血の単核細胞は、健康成人血液よりFicoll液を用いて採取した(P. Edelson, Z. A. Cohen, "In Vitro Methods in Cell Mediated and Tumor Immunity" (B. R. Bloom and J. R. David編), p333, (1976) Academic Press, New York)。この単核細胞をハム(Ham's) F-10培地(1%自己血清添加)に懸濁し、 1×10^6 細胞/ウェルの割合で培養プレート(Falcon 3047)に播種し、5%炭酸ガス培養器内で4時間培養した。その後、各ウェルをF-10培地で洗浄し、非付着細胞を除去した。ウェルに付着した細胞の95%以上が、 α -ナフチルブチレート-エステラーゼ陽性で、ラテックス粒子に対する貪食能を示す単球であった。

単球生存率：

試料濃度(終濃度) (ng/mL)	2000	500	125	31	8	2	0.5
1) サンプルA pGEX(Ferritin H) 3	0.33	0.40	0.72	0.61	0.70	0.51	0.25
2) サンプルB pGEX-2T	0.27	0.22	0.21	0.24	0.23	0.21	0.20
コントロールの単球生存率							
3) スーパーロース活性分画 (フェリチンH鎖換算で終濃度10 ng/mL)	: 0.70						
4) 試料未添加(自己血清のみ)	: 0.33						

【0040】表4に示すように、試料未添加の場合(表中の2))では、12日培養によりウェル付着単球は培養1日目から0.33まで減少するのに対し、ヒトフェリチンH鎖発現物であるサンプルAでは、終濃度2~500 ng/mLの範囲で生存率が增大していた。ヒトフェリチンH鎖を発現していないサンプルBでは生存率の増大は見られなかった。なおコントロールの3)は、T3M-30Lu細胞培養液からMoGFを精製する過程(実施例1)のスーパーロース12カラムで得られたMoGF活性分画であり、この場合の単球生存率は0.70まで回復していた。

【0037】このウェル付着細胞を5%炭酸ガス培養器内で12日間培養した。培地にはF-10培地(1%自己血清添加)を使用し、培養開始の翌日に測定試料100 μ l(終濃度は表4に示すとおり)を各ウェルに添加した。

【0038】単球の細胞数の測定は、Nakagawara and Nathanの方法(J. Immunol. Method, 56, 261, (1983))に従い、核を計数することにより行なった。すなわちヒト単球を37℃で5%炭酸ガス培養器内で12日間培養後、各ウェルから培地を取り除き、PBS 1 mLで2回洗浄した後、0.1%クエン酸、0.05%ナフトールブルーブラック、1%臭化セチルトリメチルアンモニウム(cetyltrimethylammonium bromide)溶液を100 μ L添加し、37℃で30分間処理し、ピペット操作により細胞の核を浮遊させた。この浮遊した核を血球計数板により、位相差顕微鏡下で計数して細胞数とした。単球播種1日後にウェルに付着していた細胞数の数を1.0として、培養12日後のウェルに付着していた細胞数の割合を単球生存率として計測した。なお測定はデュプリケートで行い、平均値をとった。結果を以下の表4に示す。

【0039】

【表4】

【0041】

【実施例6】

MoGF活性のアッセイ(2)：単球成長因子(MoGF)活性は、特開平3-145499と同様のアッセイにより単球の分裂能(mitotic activity： 3 H-チミジン uptake)でも確認した。すなわち実施例5と同様にして得たヒト単球(ウェル付着細胞)を5%炭酸ガス培養器内で3日間培養した。培地にはF-10培地(1%自己血清添加)を使用し、培養開始3日目に測定試料100 μ lを各ウェルに添加した。

【0042】試料添加4日目の細胞に、0.1 μ Ci/ウェ

ルの割合で10 μ lの³H-チミジン(New England Nuclear社製、比活性: 6.7 μ Ci/mmol)でパルスラベルし培養した。20時間培養後、各ウェルの培地を捨て、10% TCA (トリクロロ酢酸) 1ml添加し20分間放置した。TCA溶液を廃棄して、TCA不溶分画をメタノール/エーテル(3:1)で2回洗浄し、1N NaOH 溶液 200 μ lを添加して37℃で60分間放置して可溶化した。これを200 μ lの1N HClで中和し、シンチレーター (アクアゾール

-2)を4.5ml添加して液体シンチレーションカウンターで放射能を計測した。この³H-チミジン取込み量を、単球のDNA合成能即ち、単球の分裂能の尺度とした。なお測定はトリプリークで行なった。試料は実施例5と同じ、サンプルA、B及びスーパーロース活性分画(コントロール)を用いた。

【0043】

【表5】

試料	³ H-チミジン取込み量	
1) サンプルA: pGEX(Ferritin H)3 フェリチンH鎖相当濃度	1.6 ng/mL	6733 dpm
	0.3 ng/mL	4530 dpm
	0.0 ng/mL	1046 dpm
2) サンプルB: pGEX-2T フェリチンH鎖相当濃度	1.6 ng/mL	1587 dpm
	0.3 ng/mL	1225 dpm
3) スーパーロース活性分画 (MoGF) (フェリチンH鎖換算で終濃度10 ng/mL)		3653 dpm

【0044】表5に示すように、ヒトフェリチンH鎖発現物であるサンプルA (すなわち組換MoGF) では、ヒト単球の³H-チミジン取込みが見られ、MoGF活性が認められた。一方ヒトフェリチンH鎖を発現していないサンプルBでは有意の³H-チミジン取込みは見られなかった。試料3)は、T3M-30Lu細胞培養液からMoGFを精製する過程(実施例1)のスーパーロース12カラムで得られたMoGF活性分画(すなわち天然MoGF)であり、この場合³H-チミジン取込みが見られ、MoGF活性が認められた

【0045】

【実施例7】サンプルAの組換ヒトフェリチンH鎖(すなわち組換MoGF)を添加したヒト単球の形態学的変化を顕微鏡により調べた。図8は天然MoGF(実施例1のスーパーロース活性分画)を添加後培養8日目の単球の顕微鏡写真図、図9は組換MoGF(実施例4のサンプルA: pGEX(Ferritin H)3 発現物)を添加後培養8日目の単球の顕微鏡写真図、図10は試料未添加(1%自家血清のみ)の場合(すなわちコントロール)の培養8日目の単球の顕微鏡写真図、図11は実施例4のサンプルB (pGEX-2T発現物)を添加後培養8日目の単球の顕微鏡写真図である。

【0046】コントロール(図10; 培養8日目)に比べ、組換MoGF添加によりヒト単球細胞のサイズが大きくなり又細胞質も増大していた(図9)。この形態学的変化は天然MoGFを添加した場合と同様であった

(図8参照)。一方、ヒトフェリチンH鎖を発現していないサンプルB(図11)では、このような形態学的変

化は認められず、コントロール(図10)と同様であった。

【0047】また組換MoGFを添加した場合、ヒト単球のクラスターも認められた。このようなクラスターは単球やマクロファージが異物を攻撃する際に見られるものと同様なものである。異物が存在しなくても、MoGF添加によりヒト単球がこのようなクラスターを形成することから、本発明の組換MoGFは、特開平3-145499に開示の天然MoGF同様、ヒト単球の増殖を促進するだけでなく、ヒト単球を生体防御反応に即応し得る状態に機能分化させる誘導作用があることが示唆された。

【0048】

【発明の効果】以上のように、ヒト単球成長因子とヒトフェリチンH鎖とはアミノ酸配列上も、MoGF活性上も同一の物質であることが確認できた。得られた組換ヒト単球成長因子の全アミノ酸配列は図1に示される183個のアミノ酸配列であり、これをコードする核酸配列は図2に示される549塩基である。従って、この549塩基をDNA配列を含む発現ベクターに適宜の方法により構築し、これを発現させれば、183個のアミノ酸配列を生産することができる。

【0049】本発明の組換ヒト単球成長因子は単球の関与する生体防御反応を促進する薬剤、例えば、細胞性免疫機能の亢進、マクロファージの関与するガン免疫の亢進などの作用を有する薬剤としての用途が広く期待できる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の組換ヒト単球成長因子の全アミノ酸配

列図である。

【図2】本発明の組換ヒト単球成長因子をコードする全DNA配列図である。

【図3】既報のヒトフェリチンH鎖のアミノ酸全配列図である。

【図4】既報のヒトフェリチンH鎖遺伝子の全DNA配列図である。

【図5】T3M-30Lu細胞から得たフェリチンH鎖cDNAを挿入したベクターpBS(Ferritin H)36の構築説明図である。

【図6】発現ベクターpGEX(Ferritin H)3の構築説明図である。

【図7】発現ベクターpGEX(Ferritin H)3の構造を

示す図である。

【図8】天然MoGF(実施例1のスーパーロース活性分画)を添加した場合のヒト単球細胞の顕微鏡像を示す写真図である。

【図9】本発明の組換MoGF(実施例4のサンプルA:pGEX(Ferritin H)3発現物)を添加した場合のヒト単球細胞の顕微鏡像を示す写真図である。

【図10】試料未添加(1%自家血清のみ)の場合(すなわちコントロール)の場合のヒト単球細胞の顕微鏡像を示す写真図である。

【図11】サンプルB(pGEX-2T発現物)を添加した場合のヒト単球細胞の顕微鏡像を示す写真図である。

【図1】

```
Met Thr Thr Ala Ser Thr Ser Gln Val Arg Gln Asn Tyr His Gln 15
Asp Ser Glu Ala Ala Ile Asn Arg Gln Ile Asn Leu Glu Leu Tyr 30
Ala Ser Tyr Val Tyr Leu Ser Met Ser Tyr Tyr Phe Asp Arg Asp 45
Asp Val Ala Leu Lys Asn Phe Ala Lys Tyr Phe Leu His Gln Ser 60
His Glu Glu Arg Glu His Ala Glu Lys Leu Met Lys Leu Gln Asn 75
Gln Arg Gly Gly Arg Ile Phe Leu Gln Asp Ile Lys Lys Pro Asp 90
Cys Asp Asp Trp Glu Ser Gly Leu Asn Ala Met Glu Cys Ala Leu 105
His Leu Glu Lys Asn Val Asn Gln Ser Leu Leu Glu Leu His Lys 120
Leu Ala Thr Asp Lys Asn Asp Pro His Leu Cys Asp Phe Ile Glu 135
Thr His Tyr Leu Asn Glu Gln Val Lys Ala Ile Lys Glu Leu Gly 150
Asp His Val Thr Asn Leu Arg Lys Met Gly Ala Pro Glu Ser Gly 165
Leu Ala Glu Tyr Leu Phe Asp Lys His Thr Leu Gly Asp Ser Asp 180
Asn Glu Ser
```

【図2】

```
ATG AGACGGGT CCACCTGGA GGTGGGGAG AACTACGAC
AGGACTCAGA GGGCGCCATC AACCGCCAGA TCACCTGGA GCTCTACGCC TCTAGTTT
ACCTGTUCAT GTCTTACTAC TTTCACCGCG ATGATGTGGC TTGGAAGAAC TTGCGAAAT
ACTTCTTICA CCAATCTCAT GAGGAGAGCG AACATCTGGA GAACTGATG AAGCTGCAGA
ACCAACGAGG TGGCGCAATC TTCTTTCAGG ATATCAAGAA ACCAGACTGT GATGACTGGG
AGAGCGGGCT CAATGCAATG GAGTGTGCAT TACATTTTGA AAAAAATGTG AATCAGTCAC
TACTGGAACT GCACAACTG GCCACTGACA AAAATGACCC CCATTGTGT GACTTCATTG
AGACACATTA CCTGAATGAG CAGGTGAAG CCATCAAGA ATTEGGTGAC CACGTGACCA
ACTTGCGCAA GATGGAGGCG CCGGAATCTG GCTTGGGGA ATATCTCTTT GACAAGACA
CCCTGGGAGA CAGTGATAAT GAAAGC
```

【図3】

```
Met Thr Thr Ala Ser Thr Ser Gln Val Arg Gln Asn Tyr His Gln 15
Asp Ser Glu Ala Ala Ile Asn Arg Gln Ile Asn Leu Glu Leu Tyr 30
Ala Ser Tyr Val Tyr Leu Ser Met Ser Tyr Tyr Phe Asp Arg Asp 45
Asp Val Ala Leu Lys Asn Phe Ala Lys Tyr Phe Leu His Gln Ser 60
His Glu Glu Arg Glu His Ala Glu Lys Leu Met Lys Leu Gln Asn 75
Gln Arg Gly Gly Arg Ile Phe Leu Gln Asp Ile Lys Lys Pro Asp 90
Cys Asp Asp Trp Glu Ser Gly Leu Asn Ala Met Glu Cys Ala Leu 105
His Leu Glu Lys Asn Val Asn Gln Ser Leu Leu Glu Leu His Lys 120
Leu Ala Thr Asp Lys Asn Asp Pro His Leu Cys Asp Phe Ile Glu 135
Thr His Tyr Leu Asn Glu Gln Val Lys Ala Ile Lys Glu Leu Gly 150
Asp His Val Thr Asn Leu Arg Lys Met Gly Ala Pro Glu Ser Gly 165
Leu Ala Glu Tyr Leu Phe Asp Lys His Thr Leu Gly Asp Ser Asp 180
Asn Glu Ser
```

【図4】

プライマー1

```

10 20 30 40 50 60
TCTCTCTTGT CCGCCCATG ACCGCCGGT CCACTTGGCA GGTGGGCGAG AACTACCAACC
AGACCAATCA GGGGGGTAC TGTCTGGCCA GGTGGAGCCT CCAAGCCGTC TTGATCGTGG

70 80 90 100 110 120
AGGACTCAGA GGGCCCATC AACGCCAGA TCAACTTCCA GCTCTACGC TCCTACGTTT
TCTTGAGTCT CCGGGGTAG TTGGGGTCT AGTTUGACCT CGAGATCGCG AGGATGCAAA

130 140 150 160 170 180
ACCTGTCCAT GTCTTACTAC TTGACCGCG ATGATGTGGC TTTCAAGAAC TTTGCCAAAT
TGGACAGGTA CAGAATGATG AAATGCGCC TACTACACCG AAACCTCTTG AAACGGTTTA

190 200 210 220 230 240
ACTTCTTCTA CCAATCTCAT GAGGAGAGGG AACATGCTCA GAAACTGATG AAGCTGCAGA
TGAAGAGAGT GGTGAGAGTA CTCTCTGCC TTGTACGACT CTTTGACTAC TTGAGCTCT

250 260 270 280 290 300
ACCAAGCAGG TGGCGGATC TTCTCTCAGG ATATCAAGAA ACCAGACTGT GATGACTGGG
TGGTTCCTCC ACCGGCTTAG AAGGAAGTCC TATAGTCTTT TGGTCTGACA CTACTGACCC

310 320 330 340 350 360
AGAGCGGGCT GAATGCAATG GAGTGTGAT TACATTTGGA AAAAAATGTC AATCACTCAC
TCTCGCCCGA CTTACCTTAC CTCACAGSTA ATGTAAACCT TTTTTCAC TTAGTCAGTG

370 380 390 400 410 420
TACTGGAALT GGCACAACTG GGCAGTGACA AAAATGAGCC CCATTTGTGT GACTTCATTG
ATGACCTTGA GGTGTTTAC CCGTGACTGT TTTTACTGGG GGTAAACACA CTGAAGTAAC

430 440 450 460 470 480
AGACACATTA CCTCAATGAG CAGGTGAAAG CCATCAAGA ATTGGGTGAC CACCTGACCA
TCTGTGAAT GAGCTTACTC GTCCACTTTC GGTACTTTCT TAACCCACTG GTGCACTGCT

490 500 510 520 530 540
ACTTGGGCAA GATGGAGCG CCGGAATCTG GCTTGGCGGA ATATCTCTTT GACAAGCAGA
TGAAGCGGTT CTACCTCCOC GGGCTAGAC CGAAGCCCTT TATAGAGAAA CTGTCTGTGT

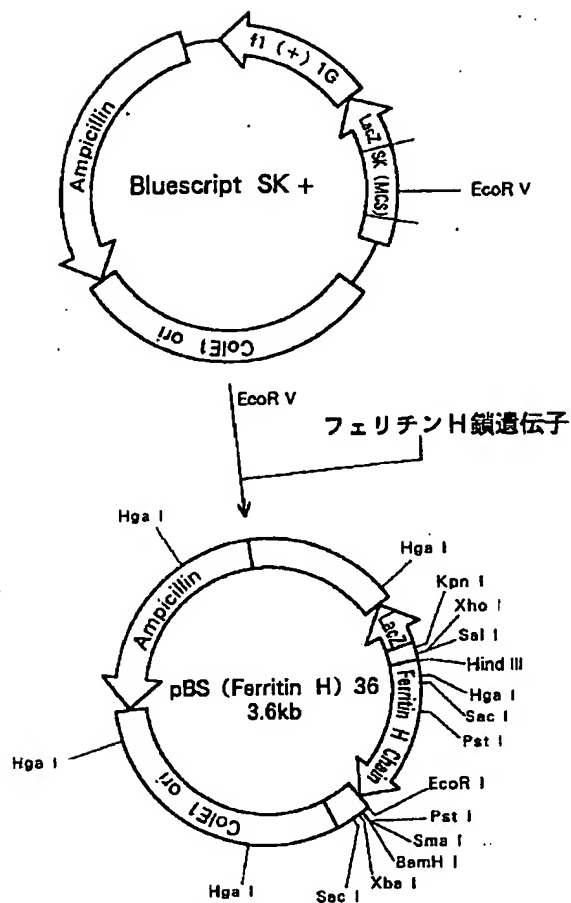
550 560 570 580 590 600
CCCTGGGAGA CAGTGATAT GAAAGCTTAG CCTCGGCGTA ATTTCCCAT AGCGTGGGG
GGGACCTCT GTCACTATTG CTTTCGATTC GGAGCCCGAT TAAAGGGGTA TCGGCACCC

610 620 630 640 650 660
TGACTTCCCT GGTCCACCAAG CAGTGCATG CATGTTT .....
ACTGAAGGGA CAGTGTGTTG CTTACGTTAC GTACAAA .....

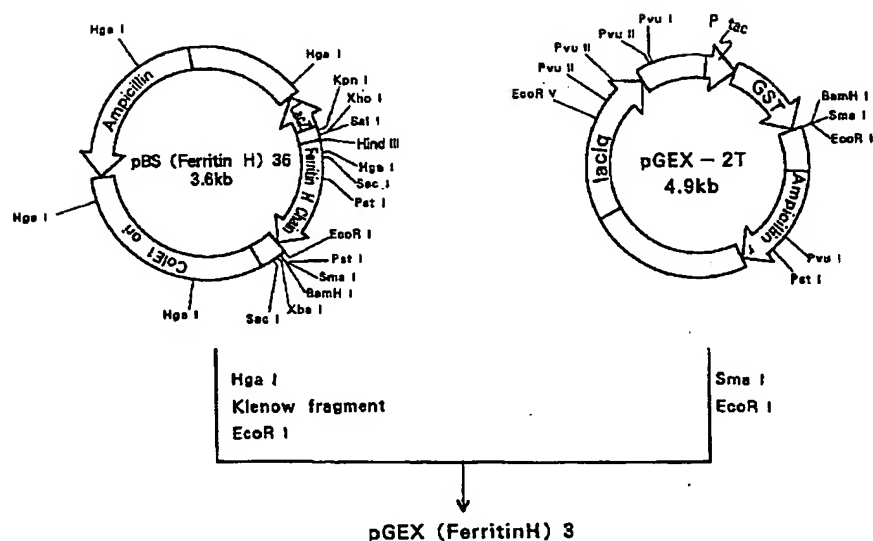
```

プライマー2

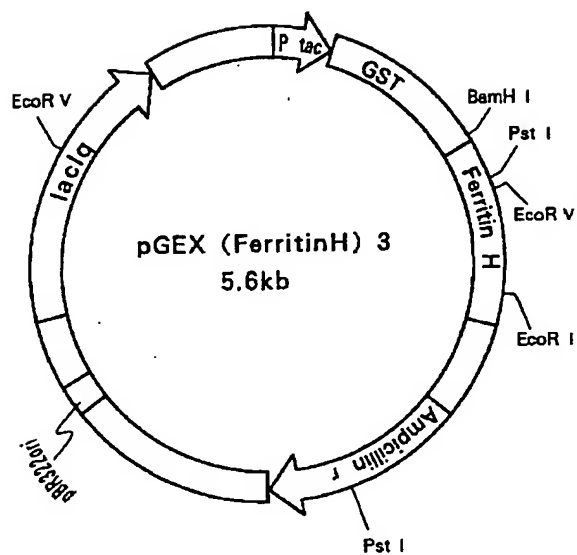
【図5】



【図6】



【図7】



【図8】

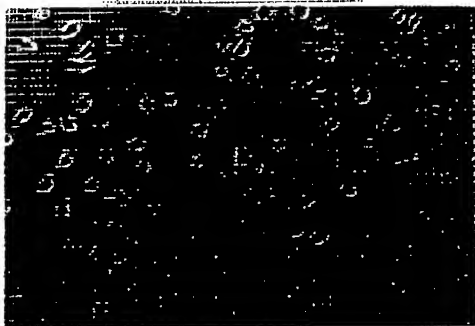
顕微鏡代用写真



写真

【図9】

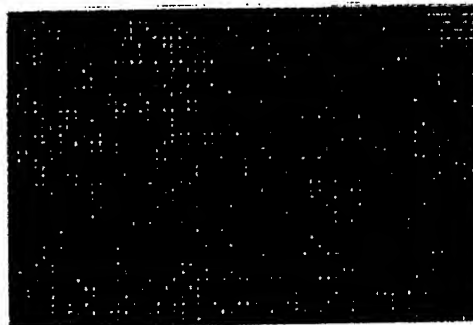
顕微鏡代用写真



写真

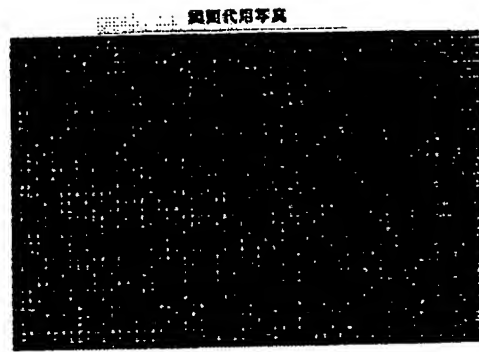
【図10】

顕微鏡代用写真



写真

【図 11】



写真

フロントページの続き

(51)Int. Cl.⁶

C 1 2 R 1:91)

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

RECOMBINED GROWTH FACTOR FOR HUMAN MONOCYTE, AND DNA SEQUENCE CODING THE SAME

Patent Number: JP7031482
Publication date: 1995-02-03
Inventor(s): OKABE TETSUO; others: 02
Applicant(s): RAIFU TECHNOL KENKYUSHO
Requested Patent: ☐ JP7031482
Application Number: JP19930200129 19930721
Priority Number(s):
IPC Classification: C12N15/09; C07K14/53; C12P21/02
EC Classification:
Equivalents:

Abstract

PURPOSE: To obtain the subject growth factor having a specific partial amino acid sequence, inducing the differentiation and multiplication of human monocytes, having a cancer immunity-stimulating action related with macrophages, and useful for medicines, etc.

CONSTITUTION: This growth factor has a partial amino acid sequence of the formula and inducing the differentiation and multiplication of human monocytes. The growth factor is obtained by culturing a host cell transformed with a DNA coding the growth factor under an expressible condition, and subsequently collecting the produced growth factor.

Data supplied from the esp@cenet database - I2